

NEW THIONINE GENE INDUCED BY SALT STRESS

Patent Number: JP10295380
Publication date: 1998-11-10
Inventor(s): YAMADA SHIGEHIO; KOMORI TOSHIYUKI
Applicant(s): JAPAN TOBACCO INC
Requested Patent: ☐ JP10295380
Application Number: JP19970120179 19970423
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new thionine gene having improving effects on salt stress resistance of plant, capable of contributing to agricultural production, comprising a gene encoding a specific amino acid sequence or a gene having homology to the gene on an amino acid base.

SOLUTION: This new thionine gene is a gene encoding an amino acid sequence of the formula or a gene having $\geq 70\%$ homology to the gene on an amino acid base, has improving effects on salt stress resistance of plant, is effective for improving salt resistance of plant and consequently is capable of contributing agricultural production. The new thionine gene is obtained by extracting the whole RNA from a green leaf tissue of *Nicotiana excelsior* subjected to salt stress, separating a mRNA by a routine procedure, preparing a cDNA library using the mRNA and screening the library by a differential screening method.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-295380

(43) 公開日 平成10年(1998)11月10日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平9-120179

(22) 出願日 平成9年(1997)4月23日

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 山田 茂裕

静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ

産業株式会社遺伝育種研究所内

(72) 発明者 小森 俊之

静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ

産業株式会社遺伝育種研究所内

(74) 代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54) 【発明の名称】 塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 植物の塩ストレスに対する耐性を向上させる効果を有する新規遺伝子を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号1、2又は3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子又は該遺伝子とアミノ酸基準で70%以上の相同性を有し、植物体の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子を提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子又は該遺伝子とアミノ酸基準で70%以上の相同性を有し、植物の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号1に示される塩基配列のうち、1nt～237ntの領域の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子又は該遺伝子とアミノ酸基準で70%以上の相同性を有し、植物の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子。

【請求項4】 配列表の配列番号2に示される塩基配列のうち、33nt～347ntの領域の塩基配列を有する請求項3記載の遺伝子。

【請求項5】 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子又は該遺伝子とアミノ酸基準で70%以上の相同性を有し、植物の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子。

【請求項6】 配列表の配列番号3に示される塩基配列のうち、48nt～365ntの領域の塩基配列を有する請求項5記載の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子に関する。本発明の遺伝子は、植物の塩ストレス耐性を向上させるのに有用である。

【0002】

【従来の技術】 植物は通常の育成環境下においても、常にストレスを受けている。このようなストレスには、塩、乾燥、高温、低温、強光、空気汚染等のさまざまなものが含まれるが、農業生産の観点から最も問題となっているのは、塩害及び乾燥である。塩害は元々塩分の高い地域のみならず、灌漑を行なうことによりそれまで問題のなかった農地においても発生し問題となっている。現在、全耕地の10%以上が何らかの塩害を受けているといわれている。また人口増加に追いつくための食料生産増加を行なうには、現在では塩害などによる耕作不適当土地とされている土地での農業生産が必要になるとの見方もある。従って、このような塩害に耐性を有する植物を見出すことは、将来起り得ると考えられる食料危機などを考慮すると非常に重要なことである。

【0003】 一方、チオニン遺伝子は、トマト、オオムギ、コムギ、バレイショ、トウガラシなどの種々の植物において単離されている。また、ニコチアナ (*Nicotiana*) 属に属する植物である *Nicotiana tabacum* L. W38 の花特異的チオニン遺伝子も単離されている (*Molecular & General Genetics* (1992), 234, 89-96) 及び *Nicotiana sylvestris*; *Plant Science* (1996), 118, 185-194)。

しかしながら、塩ストレスにより誘導されるチオニン遺伝子は知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、植物の塩ストレスに対する耐性を向上させる効果を有する新規遺伝子を提供することである。

【0005】 本願発明者らは、鋭意研究の結果、耐塩性の *Nicotiana excelsior* 及び *Nicotiana paniculata* から、塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子を見出し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は、配列表の配列番号1、2又は3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子又は該遺伝子とアミノ酸基準で70%以上の相同性を有し、植物体の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】 本願発明者らは、*Nicotiana* 属の植物について、塩および乾燥ストレス耐性のスクリーニングを行い (*Plant Physiology* (1995), 108, 106)、*Nicotiana excelsior* および *Nicotiana paniculata* を塩ストレス耐性種として選抜した (育種学雑誌、第46巻、別冊2号、188ページ)。その耐性程度は、海水の約半分の塩濃度 (250mM NaCl) 溶液を灌水しても生育が可能な程である。

【0008】 そして、これらの耐塩性 *Nicotiana* 属植物に対し、塩ストレスを加えた状態と、加えない状態のそれぞれにおける cDNA ライブラリーを作製し、これらをいわゆるディファレンシャルスクリーニング法によりスクリーニングして塩ストレスにより誘導されるチオニン cDNA を単離することに成功した。*Nicotiana excelsior* 由来の2種類のチオニン cDNA の塩基配列及びその対応アミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2に、*Nicotiana paniculata* 由来のチオニン cDNA の塩基配列及びその対応アミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。

【0009】 配列番号1～3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子は、本発明の範囲に含まれる。すなわち、これらのアミノ酸をコードしているコード領域である 1nt～237nt (配列番号1) (「nt」は第何番目のヌクレオチドという意味である)、33nt～347nt (配列番号2) 及び 48nt～365nt (配列番号3) の領域の塩基配列を有する遺伝子は本発明の範囲内に含まれる。なお、1つのアミノ酸をコードするコドンは複数存在するので、配列番号1～3に記載された塩基配列とは異なる塩基配列を有する遺伝子であっても、配列番号1～3に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子は当然本発明の範囲内に含まれる。

【0010】 さらに、一般に生理活性を有するポリペプチドにおいて、少数のアミノ酸が置換され、欠失され、挿入され又は付加されても、そのポリペプチドの生理活

性が維持される場合があることは当業者にとって周知である。従って、配列番号1〜3に示されるアミノ酸配列であって、少数のアミノ酸が置換され、欠失され、挿入され又は付加されたものであって、配列番号1〜3に示されるそれぞれのアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であって、植物の塩ストレス耐性を向上させる効果を有する遺伝子も本発明の範囲に含まれる。上記70%以上の相同性は、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上である。なお、このような、相同な遺伝子は、例えば周知の部位特異的突然変異法 (Nucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p6487-6500, 1982) 等により容易に作製することができる。なお、ここで「塩ストレス耐性を向上させる」とは、該遺伝子を導入しない場合に比べて、より高い塩濃度下において生育が可能になることを意味する。

【0011】本発明の遺伝子は、本発明により塩基配列が特定されたので、耐塩性を示す *Nicotiana excelsior* 又は *Nicotiana paniculata* の緑葉組織からの mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、この cDNA ライブラリーを鋳型として用いる、周知の RT-PCR 法により容易に調製することができる。

【0012】これまでに国内外で行われてきた、いわゆる耐塩性植物についての研究から、耐塩性植物を、非ストレス条件から塩ストレス条件に移すと新たな遺伝子の発現が誘発され、これらの遺伝子の産物が塩ストレス耐性に役立っていることが知られている。これらの事実から、今回得られた遺伝子がコードするチオニンタンパク質は、植物に水分ストレス耐性を付与する機能があると考えられる。そこで、この遺伝子の発現を制御することにより、植物の塩ストレス耐性を改良する事ができる。

【0013】植物に遺伝子を導入して形質転換を行なう方法は既に確立されており、植物の形質転換用の発現ベクターも市販されている。従って、本発明の遺伝子は、これらの公知の発現ベクターのクローニング部位に挿入後、周知の方法により植物に導入することができる。好ましい方法として、アグロバクテリウム属細菌を用いた方法を挙げることができ、この方法により双子葉植物も単子葉植物も形質転換が可能である。アグロバクテリウム属細菌を用いた双子葉植物の形質転換法としては、リーフディスク法及びプロトプラスト法 (大野孝司 (1986) ベクターの開発 - Ti プラスミド、現代化学増刊5「植物バイオテクノロジー」、山田康之、岡田吉美編、p.197-213) の第207〜212頁、及び参考文献2 (内宮博文 (1989) トランスジェニック植物、「植物遺伝情報の交換」、秀潤社、岡田吉美ら編 p261-276) が周知であり、また、アグロバクテリウム属細菌を用いた単子葉植物の形質転換方法は例えば WO 94/00977 号公報に記載されている。

【0014】本発明の遺伝子により形質転換される植物は、特に限定されるものではないが、好ましい植物の例としてダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト及びタバコを挙げることができ、なかでも、ダイズ、トウモロコシが好ましい。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

10 【0016】実施例1 <植物材料の生育>

Nicotiana excelsior および *Nicotiana paniculata* は、温室内で培養土に播種し発芽させた。本葉4枚程度まで生育した時点で、パーミキュライトとハイドロボールの混合物 (体積比1:1) を詰めた、直径約10cmの黒色ビニールポットに移植した。その後は、人工気象機内に移し (12時間日長、摂氏23℃、相対湿度70%)、1日あたり100mLの1/4希釈ホグランド溶液を灌水した。塩ストレス処理区植物には、250mM塩化ナトリウムを含む1/4希釈ホグランド溶液を1日100mL灌水した。

【0017】実施例2 <mRNAの抽出>

Nicotiana excelsior および *Nicotiana paniculata* 緑葉組織からの全RNA抽出はOstremの方法 (Ostrem et al., Plant Physiology 84, 1270-1275 (1987)) に従って行ったが、実施にあたり以下の点を改良した。

【0018】1) 磨砕した植物体を抽出用緩衝液とフェノールと共に氷上で行なう振盪を氷上で1時間行った。

【0019】2) 遠心後の上清をクロロホルムと共に氷上で行なう振盪を氷上で行った。poly(A)⁺-RNAの精製はQuickPrep mRNA purification Kit (Pharmacia 社製) を使用し、製造者の手引き書に従って行った。

【0020】実施例3 <*Nicotiana excelsior* チオニン cDNA の単離>

塩ストレスをかけた *N. excelsior* 緑葉 cDNA ライブラリーの作製は、実施例2でストレス処理をした植物から抽出、精製した poly(A)⁺ RNA を鋳型として、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 社製)、クローニングベクターには λ ZAPII (Stratagene) を使用して行った。宿主細胞として XLI-Blue を使用した。

40 【0021】cDNA ライブラリーのスクリーニングは、ディファレンシャルスクリーニング法により行った。以下にその詳細な手順を述べる。

【0022】スクリーニングを行うための溶菌ブランクは、Stratagene 社の手引き書に従って行った。ブランクが出現した寒天培地からのブランクリフトはナイロン膜の Hybond N⁺ (Amersham 社製) を用いた。一枚の寒天培地から2回ずつブランクリフトを行った。こうして作製したスクリーニング用ナイロン膜の変性は、Amersham 社の手引き書に従って行った。スクリーニングに用いた ³²P 標識プローブは以下のようにして作製した。実施例2

で得たpoly(A)⁺-RNA 50-100ngを30μlの滅菌水に溶解して、プライマー(宝酒造)1μlを加え、65°Cで10分間置いた。その後室温まで冷却し、そこにRNase阻害剤を1μl、MLV逆転写酵素添付の5X緩衝液(宝酒造)を5μl、dATP・dGTP・dTTP溶液(各10mM)を5μl、³²P-dCTP(Amersham社)を1μl(10mCi)、蒸留水を6μl加え、よく混合した後に、MLV逆転写酵素(宝酒造)を1μl加えた。この反応液を37°Cで1時間反応させた後にスピニングカラムを用いて、遊離の³²P-dCTPを除いた。プローブは、ストレス処理した植物と、ストレス処理していないコントロール植物から調製したpoly(A)⁺-RNAについて、それぞれ作製した。2組作製したナイロン膜のうち1組をコントロールプローブで、もう1組をストレスプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは製造者の手引き書に記載されている標準的な条件で16時間行なった。洗浄は、300mM NaCl、30mM trisodium citrate、0.1% SDSを用いて65°Cで20分間2回行い、続いて75mM NaCl、7.5mM trisodium citrate、0.1% SDSを用いて65°Cで20分間2回行った。コントロール区とストレス処理区の結果を比較し、ストレス処理区で強いシグナルを示す陽性クローンを得た。得られたクローンに含まれる挿入cDNA断片は、Stratagene社の手引き書に従って行って、pBluescriptプラスミドにサブクローニングした。

【0023】得られた陽性クローンの塩基配列決定は、DNAシーケンサーModel 373A(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、反応にはTaq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を使い、製造者の手引き書に従って行った。

【0024】得られた塩基配列の解析は、GENETYX-MAC *30

* ver.8(ソフトウェア開発)により行った。その結果、配列表1および2に示す2種のcDNA、NeTHI1、NeTHI2を得た。

【0025】実施例4 <Nicotiana paniculataチオニンcDNAの単離>

Nicotiana paniculataからのチオニンcDNAの単離は実施例3と同様に行ったが、ライブラリー作製にはZAP cDNA synthesis kit(Stratagene社製)をもちいて行った。ライブラリー作製およびプローブ作製には実施例2でN. paniculataから得たpoly(A)⁺-RNAを用いて行った。その結果、配列表3に示すcDNA、NpTHI1を得た。

【0026】

【発明の効果】本発明により、植物の塩ストレスに対する耐性を向上させることができる新規な遺伝子が提供され、その塩基配列も決定された。従って、本発明は各種植物の耐塩性向上に有効であり、ひいては農業生産に貢献するものである。

【0027】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 456

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: Nicotiana excelsior

性質: チオニンのcDNA (NeTHI1)

配列の特徴

1..240 CDS

配列

```

CTC TTT GTT GCC TAT GAG GTG CAA GCT AGA GAA TGC GCA AGA GAA ATT      48
Leu Phe Val Ala Tyr Glu Val Gln Ala Arg Glu Cys Ala Arg Glu Ile
1          5          10          15
TTC ACT GGA CTA TGC ATT ACC AAT CCA CAA TGC AGA AAA GCT TGT ATC      96
Phe Thr Gly Leu Cys Ile Thr Asn Pro Gln Cys Arg Lys Ala Cys Ile
20          25          30
AAA GAG AAA TTT ACT GAT GGT CAT TGT AGC AAA ATC CTC AGA AGG TGT      144
Lys Glu Lys Phe Thr Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys
35          40          45
CTA TGC ACT AAG CCA TGC ACA GGA GCT GAA ACT TTA GCT GAG GAA GCA      192
Leu Cys Thr Lys Pro Cys Thr Gly Ala Glu Thr Leu Ala Glu Glu Ala
50          55          60
ACA ACT TTG GCT GCA GCT TTG CTT GAA GAA GAG ATA ATG GAT AAC      237
Thr Thr Leu Ala Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Ile Met Asp Asn
65          70          75
TAATTAGAGA TTAGAATAAA TTAAGGATGG AGAGTCACAC ATAATAAAGT TTCTACCTTT      297
CTTAAAGTG TAGCTAATGT TGTGTTTAA TTGGCTTTTA GTAGCCCTTTT ATTACACTTT      357
AATAAGTGT GGCACCTCAA CCCTTTGTGC AATCTTGCAC TAAGTTTATTT CGTGTACTTT      417
TAATGAAAT CACCTTCTAT GGTGTTTTGTT TAAAAAAA                                456

```

(5)

特開平10-295380

7

8

【0028】配列番号：2

※ 起源

配列の長さ：566

生物名：Nicotiana excelsior

配列の型：核酸

性質：チオニンのcDNA (NeTHI2)

鎖の数：二本鎖

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

33..350 CDS

配列の種類：cDNA to mRNA

※

配列

```

TTCCTATCCT TTTTACTCA TTCAAAGTAA CT ATG GCT CCG TCC GTG TGC TTC      53
                               Met Ala Arg Ser Val Cys Phe
                               1           5

ATG GCA TTT GCT ATC TTG GCA GTG ATG CTC TTT GTT GCC TAT GAT GTG      101
Met Ala Phe Ala Ile Leu Ala Val Met Leu Phe Val Ala Tyr Asp Val
      10           15           20

GAA GCT AAA GAT TGC AAA ACA GAA AGC AAT ACA TTC CCT GGA ATA TGC      149
Glu Ala Lys Asp Cys Lys Thr Glu Ser Asn Thr Phe Pro Gly Ile Cys
      25           30           35

ATT ACC AAA CCA CCA TGC AGA AAA GCT TGT ATC AAA GAG AAA TTT ACT      197
Ile Thr Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Ile Lys Glu Lys Phe Thr
      40           45           50           55

GAT GGT CAT TGT AGC AAA ATC CTC AGA AGG TGT CTA TGC ACT AAG CCA      245
Asp Gly His Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys Leu Cys Thr Lys Pro
      60           65           70

TGT GTG TTT GAT GAG AAG ATG ATC AAA ACA GGA GCT GAA ACT TTA GCT      293
Cys Val Phe Asp Glu Lys Met Ile Lys Thr Gly Ala Glu Thr Leu Ala
      75           80           85

GAG GAA GCA ACA ACT TTG GCT GCA GCT TTG CTT GAA GAA GAG ATA ATG      341
Glu Glu Ala Thr Thr Leu Ala Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Ile Met
      90           95           100

GAT AAC TAATTAGAGA TTAGAATAAA TTAAGGATGG AGAGTCACAC ATAATAAAGT      397
Asp Asn
      105

TTCTACCTTT CTAAAAGTG TAGCTAATGT TGTGTTTAA TTGGCTTTTA GTAGCCTTTT      457
ATTACACTTT AAATAAGTGT GCACTTCAA CCCTTTGTGC AATCTTGCAC TAAGTTTATT      517
CGGTACTTTT TAATGAAAAT CACCTTCTAT GGTTTTGTGT TAAAAAATAA      566

```

【0029】配列番号：3

※ 起源

配列の長さ：558

生物名：Nicotiana paniculata

配列の型：核酸

性質：チオニンのcDNA (NpTHI1)

鎖の数：二本鎖

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

48..368 CDS

配列の種類：cDNA to mRNA

※40

配列

```

GTTTATTAT TATTAACTCT TATCTTTTTT ACTCAITCAA AGAAACT ATG GCT CGC      56
                               Met Ala Arg
                               1

TCC TTG TGC TTC ATG GCA TTT GCA GTC TTG GCA ATG ATG CTT TTT GTT      104
Ser Leu Cys Phe Met Ala Phe Ala Val Leu Ala Met Met Leu Phe Val
      5           10           15

GCC TAT GAG GTG CAA GCT AAG AGT ACT TGC AAA GCA GAA AGC AAT ACA      152
Ala Tyr Glu Val Gln Ala Lys Ser Thr Cys Lys Ala Glu Ser Asn Thr
      20           25           30           35

```

(6)

特開平10-295380

9

10

TTC CCT GGA TTA TGC ATT ACC AAA CCA CCA TGC AGA AAA GCT TGT CTC	200
Phe Pro Gly Leu Cys Ile Thr Lys Pro Pro Cys Arg Lys Ala Cys Leu	
40 45 50	
AGT GAG AAA TTT ACT GAT GGA AAA TGT AGC AAA ATC CTC AGA AGG TGC	248
Ser Glu Lys Phe Thr Asp Gly Lys Cys Ser Lys Ile Leu Arg Arg Cys	
55 60 65	
ATT TGC TAC AAG CCA TGT GTA TTT GAT GGA AAG ATG ATC CAA ACA GGA	296
Ile Cys Tyr Lys Pro Cys Val Phe Asp Gly Lys Met Ile Gln Thr Gly	
70 75 80	
GCT GAA AAT TTG GCC GAG GAA GCA GAA ACT TTG GCT GCA GCT TTG CTT	344
Ala Glu Asn Leu Ala Glu Glu Ala Glu Thr Leu Ala Ala Ala Leu Leu	
85 90 95	
GAA GAA GAG ATG ATG GAT AAC TAATTAGAGA TTATAAGAAA TTAAGGATGA	395
Glu Glu Glu Met Met Asp Asn	
100 105	
AGTGTACAC ATAATAAAGT GCTGCCCTTC TTAAAAGTGT ACCTAATGTT GTGTTCTTAT	455
TGGCTTTTAG TAGCCGTTTG TTACACTTAA AATAAGTGTG GCACATCAAT CCTTTGTTAC	515
TTTAAATGAA AATGATCTTC TATGCTCTTT GTTTAAAAA AAA	558